

山形医学 2010 ; 28 (2) : 77-81

第20回実験動物セミナー研究成果発表会抄録

Abstracts of the 20th Seminar of Laboratory Animal Center

2009年12月17日 山形大学医学部視聴覚室

1. 凝固XIII (13) 因子ノックアウトマウスを用いた妊娠期の出血機序の解析

張偉光, 惣宇利正善, 岩田宏紀, 小関・久野しおり,
一瀬白帝 (山形大学医学部分子病態学講座)

血液凝固XIII因子 (FXIII) は、Aサブユニット (FXIII-A) の二量体とBサブユニット (FXIII-B) の二量体が結合して、血漿中に存在する。FXIII-Aはフィブリン同士を架橋結合させて、強固なフィブリン塊を作る。FXIII-Bは血漿中のFXIII-Aの安定化に働く。FXIII-Aは二量体として細胞内にも存在する。反復性自然流産は先天性FXIII欠損症の症状の一つであるが、血漿中や細胞内FXIII-Aの妊娠中の止血における役割は不明なので、ノックアウトマウスを用いて解析した。

野生型、FXIII-A^{-/-}、FXIII-B^{-/-}マウスをそれぞれの系統内で交配させると、FXIII-A^{-/-}マウスは妊娠中に臍から出血して6割が死亡した。一方、FXIII-B^{-/-}マウスでは、妊娠中に臍からの出血により死亡したケースはなかった。FXIII-B^{-/-}マウスでは、非妊娠時の血漿中のFXIII-Aが野生型の2%未満に低下しているが、妊娠中はさらに低下して、検出限界以下となった。妊娠10日目にsacrificeし、FXIII-B^{-/-}マウスの子宮の切片をヘマトキシリン・エオシン染色で観察すると、子宮腔、床脱着膜と胎盤での出血が認められたが、FXIII-A^{-/-}マウスより統計学上有意に軽度であった。抗FXIII-A免疫染色で多数のFXIII-A陽性細胞が野生型とFXIII-B^{-/-}マウスの床脱着膜に検出されたが、FXIII-A^{-/-}マウスには全く検出されなかった。

今回の実験結果により、細胞内FXIII-Aが妊娠中の止血に重要な役割を果たしていることが明らかになった。ただし、極微量に存在すると思われる血漿中のFXIII-Aが作用している可能性を完全に除外することができないので、更なる研究が必要と思われる。

2. IL-21アイソフォームトランスジェニックマウスを用いたデキストラン硫酸ナトリウム誘発大腸炎の解析

荒木明美, 奈良英利, Mizanur Rahman,
Farha Matin Juliana, 金蓮今, 浅尾裕信 (山形大学医学部免疫学講座)

【目的】炎症性腸疾患は、その一因として、Th17細胞（炎症性サイトカインIL-17産生ヘルパーT細胞）の外來抗原に対する免疫応答異常が考えられている。近年、このTh17細胞がIL-21により分化誘導されることが報告され、IL-21と炎症性腸疾患との関わりが注目されている。そこで本研究では、IL-21 isoform transgenic マウス (IL-21 isoTG: IL-21より低活性であるが同様の機能を持つIL-21 isoformをT細胞特異的に発現させたマウス) を用いて、大腸炎発症におけるIL-21の関与について解析を行った。

【方法】野生型マウスとIL-21 isoTG (C57BL/6, BALB/c バックグラウンド) に3%~5%のデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を

自由飲水させ、体重測定と血便観察を行い、大腸炎の発症と進行状況を確認した。大腸炎発症後、大腸、腸間膜リンパ節等を摘出し、大腸は長さを測定後、RNA抽出と組織解析に供した。

【結果・考察】DSSに高感受性のC57BL/6では、IL-21 isoTGと野生型マウス間で大腸炎の発症に有意差は得られなかったが、BALB/cでは、野生型マウスに比し、IL-21 isoTGで、有意に大腸炎が誘導されやすい結果が得られた。今後は、RT-PCR法によりIL-17を含めた炎症性サイトカインやケモカインの発現を解析する予定である。

3. モデルマウスを用いた全身性エリテマトーデス (SLE) と酸化ストレスの関連についての検討

鈴木紗織, 井内良仁, 岐部紀子, 岡田太, 藤井順逸 (山形大学医学部生化学・分子生物学講座)

活性酸素種の一つ、Superoxideを消去する抗酸化酵素であるSuperoxide dismutase (SOD) は、老化や酸化的障害の抑制に重要である。細胞質やミトコンドリアに存在するCuZn-SODをコードするSOD1遺伝子をノックアウトしたSOD1-KOマウスは、赤血球内酸化ストレスが上昇し、加齢に伴う抗赤血球抗体の産生亢進により自己免疫性溶血性貧血 (AIHA) 様の症状を示す。我々はAIHAのモデルであるNew Zealand Black (NZB) マウスでも、赤血球内活性酸素種が上昇することを明らかにし、抗赤血球抗体生成に酸化ストレスが関与する可能性を報告した。全身性に障害の現れるSLEではAIHAを合併することが多く、NZBとNZWマウスの雑種第一世代の (NZB×NZW) F1マウスはSLEのモデルマウスであるなど、共通の要因が関与している可能性がある。そこで今回、SOD1を欠損する (NZB×NZW) F1マウスを作製し、その表現型を解析することにより、SLE発症への酸化ストレスの関与について検討した。

4. 5-アミノレブリン酸合成酵素ALAS-N mRNA概日リズム消失マウスの確立とその表現型解析

清水和弘, 合津卓磨, 岡野聡, 中島修 (山形大学医学部遺伝子実験施設)

近年、時計遺伝子産物に対して、ヘムが直接相互作用して、その機能を制御している可能性が示されている。ヘム合成系律速酵素として、肝臓など多くの組織におけるヘム供給を制御している、5-アミノレブリン酸合成酵素ALAS-N mRNAレベルが概日変動することが知られている。ALAS-N mRNAレベルの概日変動がヘム生産の変動をもたらすことで、ヘムを介した概日性機能調節に直接関連していることが考えられる。そこで、我々は、既に確立しているALAS-N 遺伝子破壊マウス (AN^{-/-}マウス) に対してALAS-Nトランスジェニックマウス (AN-Tgマウス) と交配することでAN^{-/-}マウスの胎生致死を回避してALAS-N mRNAレベルの概日変動が起こらないALAS-N無変動マウス (AN^{-/-}::AN-Tgマウス) を確立した。このマウスにおけるALAS-N mRNAレベルを解析したところ、概日変動が無くなっていることを確認している。野生型において

mRNAレベルが概日変動することが知られており、生物時計に関与している遺伝子（Per2, DBP）のmRNAレベルを解析したところ、AN-/-:AN-Tgマウスでも野生型と同様の概日変動が認められた。また概日行動について野生型と比較したところ、大きな変化は見られなかった。現時点でのAN-/-:AN-Tgマウスに対する解析結果では、ALAS-N mRNAレベルの概日変動が、個体での概日リズムをもつ生理機能に直接影響を与えている証拠は得られていないことから、ALAS-N mRNAレベルの概日変動は、個体における概日性機能調節には必須ではないと考えられる。

5. 酸化チタンナノ粒子による発癌過程促進の可能性

小沼邦重, 白澤信行*, 藤井順逸, 岡田太 (山形大学医学部生化学・分子生物学講座, *同解剖学第一講座)

【目的】生体や環境に対する影響が懸念されながらも既に実用化に至っている酸化チタンナノ粒子に注目し、これが発癌過程を促進するか否かを検討した。

【方法と結果】同一素材のナノ粒子を、親水性および疎水性処理したものを用いた。細胞株はC57BL/6マウス由来の線維肉腫で、正常同系マウス皮下に移植すると自然退縮するQR-32細胞を用いた。QR-32細胞（ 1×10^5 個）と酸化チタン（5 mg）を移植直前に混ぜて皮下接種した。さらに、酸化チタンを皮下に予め接種後、30日および70日後に移入した部位にQR-32細胞を移植して、その増殖性の回復を観察した。その結果、親水性酸化チタンを予め移入した群にのみQR-32細胞の致死的な増殖を認めた。酸化チタンはそれ自体活性酸素を生成するが、QR-32細胞内にも活性酸素を生成し細胞を傷害をした。これは疎水性酸化チタンにより強く認められた。また、この傷害性の程度は細胞形態学的な変化としても観察された。QR-32細胞と酸化チタンを継続添加培養すると、細胞傷害性から生き残った細胞はマウスに致死増殖した。

【総括】以上の結果より、一部の酸化チタンナノ粒子は、発癌過程を促進させる可能性のあることを明らかにした。

6. 屈指腱損傷に対する多血小板血漿の影響：器官培養での検討

(In vitro study : effect of Platelet-Rich Plasma on tendon repair)

佐藤大祐, 高原政利*, 成田淳, 山川淳一, 伊藤和生**, 橋本淳一, 荻野利彦 (山形大学医学部整形外科科学講座, *医療法人泉整形外科病院, **医療法人茶畑会相馬中央病院)

【目的】多血小板血漿 (PRP: Platelet-Rich Plasma) は、PDGF、TGF、VEGF、EGF等の成長因子を含んでおり、培養腱細胞を増殖させる。また、フィブリンを用いることにより成長因子の作用が持続して組織修復を促進させる。そこで、PRPのフィブリン複合体を用いて断裂屈指腱の修復を促進させることを目的とした。今回は、腱の器官培養を行い、腱細胞や腱上膜の反応を観察した。

【方法】日本白色家兔の自己血を遠心してPRPを精製した。全麻下に兔の第2から第4趾の腓側趾屈指腱を摘出して、部分断裂を作製した。断裂部に、PRPとフィブリンを投与する群 (PF群)、フィブリンのみを投与する群 (F群)、および何も投与しない群 (N群) の3群に分けた。腱を縫合した後、8 mm長に切り出して4日と10日間器官培養した。HE染色を行い、腱実質損傷端の細胞密度、腱上膜損傷端の細胞数、および腱上膜の厚さを計測した。PCNA染色とTUNEL染色を行い、腱損傷端の細胞の陽性率を計測した。また、断裂部の連続性を点数化して腱修復の半定量的評価を行っ

た。

【結果】培養4日では、腱実質損傷端の細胞密度と腱上膜損傷端の細胞数は、PF群が有意に高値を示した。

培養10日では、腱実質損傷端の細胞密度と腱上膜損傷端の細胞数は、各群間に有意差を認めなかった。腱損傷端の細胞のPCNA陽性率は、PF群がN群と比較して有意に高値を示した。腱損傷端の細胞のTUNEL陽性率は、PF群が最低値を示したが、有意差を認めなかった。

腱修復の半定量的評価と腱上膜の厚さは、各群間に有意差を認めなかった。

【考察】PRPのフィブリン複合体投与群では、培養損傷腱の腱細胞数や腱上膜細胞数、および腱細胞のPCNA陽性率が有意に高値を示した。PRPのフィブリン複合体投与は、培養損傷腱の腱細胞を増殖させ、細胞数を増加させる効果がある。PRPのフィブリン複合体投与群において、腱の器官培養では修復促進は明らかではなかった。

7. 海馬ニューロンの樹状突起形成におけるベータ型ジアシルグリセロールキナーゼの役割

八月朔日泰和, 後藤薫 (山形大学医学部解剖学第二講座)

ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) は、プロテインキナーゼCの活性化因子として知られる二次伝達物質、ジアシルグリセロールをリン酸化する。DGKアイソザイムのうち、ベータ型DGK (DGK β) は線条体と海馬に特に強い発現を示す特徴を有する。我々はDGK β 特異抗体を作製し、線条体について詳細にその神経細胞内局在を解析してきた。本研究では海馬神経細胞に注目し、DGK β の発現と局在を免疫組織化学的に詳細に検討した。また遺伝子導入実験を行い、DGK β の機能的役割を追究した。

DGK β は海馬錐体細胞層において投射ニューロンと介在ニューロンの両方に発現し、棘突起においてはシナプス後膜肥厚傍の細胞膜に優位に局在していた。海馬培養細胞に対する遺伝子導入実験の結果、培養開始後早期に野生型DGK β を遺伝子導入するとその一部はアクチンと共存し、神経突起の伸長および棘突起の成熟化を促進した。一方、酵素活性を欠失する変異型DGK β を遺伝子導入した海馬細胞に形態変化は認められなかった。以上よりDGK β が海馬神経細胞シナプス後部において、酵素活性を介して樹状突起およびシナプス形成過程に関与する可能性が示唆される。

8. 条件づけ味覚嫌悪反応における文脈の効果と海馬破壊の影響

藤原浩樹, 山崎良彦, 千田邦明, 金子健也, 藤井聡 (山形大学医学部生理学講座)

条件づけ味覚嫌悪における背景文脈の効果を検討するため、復元効果という現象を用いて、消去手続きの前後で背側海馬を破壊し、文脈の変化と背側海馬破壊の影響を検討した。条件づけ、消去、テストの背景文脈を統一した群と消去の背景文脈だけが異なる群を比較した。消去の背景文脈だけが異なる群ではテストにおいて条件反応の回復が考察され、条件づけ味覚嫌悪において復元効果を確認することができた。消去前、または、消去後に背側海馬破壊を行うと、消去の背景文脈だけが異なる群では復元効果が抑制された。これらの結果から背側海馬が復元効果の文脈変化に関与していることが示唆された。さらに消去後に背側海馬破壊を行うと、条件づけ、消去、テストの背景文脈を統一した群に条件反応が見られた。この結果か

らは消去記憶が海馬以外に形成され、海馬破壊により混乱させられたことが示唆された。以上の検討結果から、背側海馬が物理的な背景文脈の変化、消去記憶の形成に関わっている可能性が示唆された。

9. AAVを用いたA53T変異型 α シヌクレインのin vivo過剰発現：パーキンソン病モデルとしての特徴について

佐藤裕康，町屋陽平，荒若繁樹，加藤丈夫（山形大学医学部内科学第三講座）

パーキンソン病（PD）は、病理学的に黒質ドパミン神経細胞の変性脱落と α シヌクレイン（ α S）を主要構成成分とするレビー小体の出現によって特徴づけられる。 α S遺伝子のミスセンス変異および重複が一部の家族性パーキンソン病の原因であることが発見されて以来、 α SがPDの病態の中心的な役割を担っていると考えられている。既報告の α Sトランスジェニックマウスでは、ドパミン神経終末の変性と神経細胞内にレビー小体様凝集物が出現する。しかし、ヒト患者と同じようなドパミン神経細胞の脱落を示さない。これまでの報告ではアデノ随伴ウイルス（AAV）を用いて α Sを中脳黒質に過剰発現させたラットモデルにおいて、AAV接種後4～8週間で約55%のドパミン神経細胞の脱落を認めている。今回我々は、AAVを用いて中脳黒質に家族性PDにおいて同定されたA53T変異型 α Sを過剰発現させ、接種後4週間でドパミン神経細胞が約90%脱落するモデルの作製に成功した。このラットに生じる病理学的変化および生化学的変化についてヒトPDとの異同を比較しながら、PDモデルとしての有用性について検討した。

10. Dominant negative (DN) MafBトランスジェニックマウスの検討

佐藤道子，柴田陽光，木村友美，阿部修一，會田康子，岸宏幸，福岡幸治，小坂太祐，山内啓子，井上純人，久保田功（山形大学医学部内科学第一講座）

【背景】肺胞マクロファージ（AM）はCOPDの病態形成に重要な役割を果たしている。これまで我々は、喫煙暴露マウスのAMで転写因子MafBの発現が亢進し、さらにMafBがAMのアポトーシスを抑制していることを報告した。また、重喫煙者のCOPD患者の検討でも同様に、AMのMafB発現が亢進していた。しかし、これまで遺伝子改変マウスを用いてのAMにおけるMafBの役割を報告した文献はない。

【方法】Macrophage Scavenger receptor 1-enhancer/promoter-DN MafBトランスジェニックマウスを作製した。BALを行いAM数を解析した。

【結果】気管支肺胞洗浄液中の細胞濃度は、コントロール群よりもDN MafB群で有意に減少していた。

【考察】DN MafBマウスの解析から、MafBがAMの生存に影響を及ぼしている可能性が示唆された。当マウスを用いた検討がCOPDの病態を解明する契機になると考えられた。今後、マウスの表現型解析とともにMafBの機能解析を進める方針である。

11. マウス心臓における加齢指標蛋白30（SMP30）の機能解析

石野光則，佐々木敏樹，矢野哲郎，舟山哲，瀬津俊介，桐林伸幸，加藤重彦，渡邊哲，久保田功（山形大学医学部内科学第一講座）

加齢指標蛋白30（Senescence Marker Protein-30; SMP-30）は肝臓に加齢に伴って減少する蛋白質として発見され、これまでに

抗アポトーシス作用や抗酸化作用などの機能を持つことが報告されている。しかし、心臓におけるSMP-30の機能はいまだ明らかになっていない。そこでSMP-30ノックアウト（KO）マウスおよびSMP-30心臓過剰発現トランスジェニック（TG）マウスを用いて、心臓虚血・再灌流モデルにおけるSMP-30の機能を明らかにすることを目的とした。SMP-30心臓過剰発現TGマウスを作製し、SMP-30 KOマウス、野生型と3つのタイプでフェノタイプが変わらないことを確認した。SMP-30 KOマウス、SMP-30 TGマウスおよび野生型マウスに虚血・再灌流モデルを作製し、梗塞領域を検討したところ野生型と比較して梗塞サイズはSMP-30 KOマウスで有意に増加し、SMP-30心臓過剰発現TGマウスで有意に減少していた。今後はSMP-30の抗アポトーシス作用やAktリン酸化抑制などの細胞内シグナルなどを検討し、そのメカニズムについて解明していく予定である。

12. 肥満モデルラットに対するアンジオテンシンII 1型受容体拮抗薬の効果の検討

横澤潤二，伊藤純一，宇賀神智，佐藤智佳子，芳賀弘明，石井里佳，三條麻衣，奥本和夫，西瀬雄子，渡辺久剛，齊藤孝治，齋藤貴史，富樫整*，河田純男（山形大学医学部内科学第二講座，*山形大学保健管理センター）

【背景と目的】アンジオテンシンIIは高血圧、動脈硬化、インスリン抵抗性、肝臓における脂肪沈着・炎症を促進すると報告されている。我々は肥満によるインスリン抵抗性や脂肪肝に対し、アンジオテンシンIIシグナルをターゲットとした薬剤治療の効果を肥満モデル動物を用いた実験により検討した。

【実験法】肥満モデルである6週齢のZucker Fattyラットに高脂肪食を8週間与えた。その一部に強力なアンジオテンシンII 1型受容体拮抗薬（以下ARB）であるオルメサルタンを4週間経口投与（10 mg/kg body/day）した後、血清中のグルコースとインスリン、肝臓組織中の中性脂肪含有量を測定した。またインスリン抵抗性と組織内中性脂肪沈着の改善作用があるアディポネクチンの血清中濃度も測定した。

【結果と考察】血清中のグルコースとインスリン、肝臓組織中の中性脂肪は高脂肪食負荷により増加したが、オルメサルタン投与により有意に低下したことから、ARB投与によりインスリン抵抗性と肝臓脂肪沈着が抑制されたと示唆される。また血清アディポネクチンは高脂肪食負荷により低下したが、オルメサルタン投与により有意に上昇したことから、ARB投与によりアディポネクチン分泌が回復したと示唆される。

13. 食後中性脂肪高値による血管機能変化

五十嵐祐子，清水良美，福田直樹*，菱沼早織，柏葉美，伊藤恒賢*，片野由美，石幡明（山形大学医学部臨床看護学講座，*同動物実験施設）

【目的】高コレステロール血症と虚血性心疾患の関係についてはこれまで多くの報告があるが、高トリグリセリド血症の役割については明らかにされていない。そこで本研究では、山形大学医学部動物実験施設で開発された遺伝性食後高トリグリセリド血症家兎（Postprandial hypertriglyceridemia rabbit: PHT）を用いて、食後高トリグリセリド血症が血管機能にもたらす影響を検討した。

【方法】26～31週齢の遺伝性食後高トリグリセリド血症家兎

(PHT) と、同週齢の日本白色家兔 (JW) から胸部大動脈リング標本を作製した標本を、混合ガス (95% O₂、5% CO₂) を通気した Krebs-Henseleit 液 (37±0.1℃) を満たしたorgan bathに懸垂し、等尺性トランスデューサーを用いて収縮張力を測定した。

【結果】

- 1) PHTにおけるアセチルコリンによる血管弛緩反応は、JWより減弱していた。
- 2) フェニレフリンによる血管収縮反応、NPによる平滑筋弛緩反応には、JWとPHTに差はなかった。
- 3) AIIによる血管収縮反応は、JWに比べPHTの方が弱い傾向があった。JWにおいてのみ、AIIの血管収縮反応は、L-NAME 存

在下で有意に増強した。一方、diclofenac存在下では両群ともに収縮は影響されなかった。

【考察】

- 1) PHTでは内皮機能がJWよりも減弱し、NO産生遊離が低下している可能性があること。
- 2) 血管平滑筋の cGMPを介する弛緩反応は、遺伝性食後高トリグリセリド血症に影響されないこと。
- 3) AII収縮反応には、PGsはほとんど関与していないこと、が示唆された。

【結論】高トリグリセリド血症によって内皮機能が選択的に障害され、NO産生が減少することで高血圧や動脈硬化の原因になる可能性がある。